

培養皮膚線維芽細胞における Glucosylceramide の代謝に関する研究

— Gaucher 病各病型における Glucosylceramide の代謝 —

草 野 孝

札幌医科大学小児科学講座 (主任 中尾 亨 教授)

Glucosylceramide Metabolism in Cultured Skin Fibroblasts

Takashi KUSANO

Department of Pediatrics Sapporo Medical College
(Chief : Prof. T. Nakao)

Glucosylceramide (Glc-cer) consists of equimolar portions of the long-chain amino alcohol, that is, sphingosine, a long-chain fatty acid, and glucose. Gaucher disease is caused by a genetically determined defect in the degradation of Glc-cer by Glc-cer β -glucosidase which results in an accumulation of Glc-cer in certain organs.

Glc-cer is derived from the degradation of ganglioside in the brain and viscera, lactosylceramide in white blood cells, and glycosphingolipids and globotetraosylceramide in red blood cells. Gaucher disease is classified into three major clinical types. All three types have a deficiency of Glc-cer β -glucosidase. The residual activity measured *in vitro* does not reflect the severity of the disease. β -Glucosidase activity has been assayed exclusively *in vitro*. It recently has become apparent that measurement of lysosomal enzyme *in vivo* provides new information regarding lipid metabolism.

In this study the uptake and subsequent metabolism of (^{14}C) stearic acid-labelled Glc-cer into cultured skin fibroblasts from controls, patients with type I and type II Gaucher disease were examined.

There was no significant differences in the uptake of Glc-cer between the cultured cells from controls and from patients with Gaucher disease.

In each cell line, Glc-cer was metabolized to ceramide and fatty acid, which was reutilized in the synthesis of major lipids found in the cultured fibroblasts. But the rate of hydrolysis in Glc-cer taken up by the cells was different in each of the type. Cells from the controls could metabolize 80% of the Glc-cer after 6 days. While, cells from type II and type I Gaucher disease could metabolize 50% and 60%, respectively.

These results are in contrast to the *in vitro* results which demonstrated a very low activity for β -glucosidase in each type of Gaucher disease, and reflect the severity of the clinical course of this disease.

(Received August 28, 1986 and accepted October 6, 1986)

Key words: Glucosylceramide, *In vivo* β -glucosidase activity, *In vitro* β -glucosidase activity, Fibroblast, Gaucher disease

1 緒 言

Gaucher 病は, Tay-Sachs 病について, もっとも歴史の古いリビードシスで, 1882 年, Phillip. C. E. Gaucher によって, はじめて, 慢性, 進行性の肝脾腫

を示す 1 例が報告された。その後, 同様の症状を示す症例が報告されるようになり, 1924 年, Lieb らは, 患者脾より蓄積物質を分離し, その本態は, 複合糖脂質, セレブロンドであると報告した。1933 年 Aghion により, 本症患者脾に蓄積しているセレブロンドは, 末端

にグルコースが β -結合している Glucosylceramide (Glc-cer)であることが報告され、その後の分析によっても確認された¹⁾。

1965年 Brady²⁾がその原因が、Glc-cerの合式促進ではなく、Glc-cerをGlucoseとceramideに分解する加水分解酵素 Glc-cer β -glucosidase (Glucocerebrosidase)による Glc-cerの分解過程の障害によると結論した。その後、多くの臨床報告により、本症が、常染色体劣性遺伝型式をとる先天性脂質代謝異常症であることが判明し、更に、臨床経過により、成人型 Gaucher 病 (non neuronopathic form, adult or type I Gaucher 病)、乳児型 Gaucher 病 (acute neuronopathic form, infantile or type II Gaucher 病)、若年型 Gaucher 病 (subacute neuronopathic form, juvenile or type III Gaucher 病)に分類された。本症の発生頻度は、欧米で1/75,000であり、本邦での発生頻度は、やや低いものと考えられる。

成人型 Gaucher 病は、肝脾腫、血小板減少、貧血、白血球減少などの脾機能亢進症状、四肢の疼痛などを示すが、神経症状は認められない。通常、乳幼児期に、脾腫と肝腫大に気付かれるが、そのほかの症状は、ほとんど認められない。10歳代になると四肢の疼痛を訴えることが多くなり、Gaucher細胞の骨髄への浸潤による血管圧迫により、ときに病的骨折が認められる。肺への浸潤が強い場合には、呼吸障害、肺性心により早期に死亡することもあるが、一般に生命予後は悪くない。欧米では、この成人型 Gaucher 病が、Gaucher 病全体の大半を占めるといわれており、また、Ashkenazi Jewsにおいて、その発生頻度は約30倍高いといわれている³⁾。乳児型 Gaucher 病は、生後2~3カ月で肝脾腫を認め、通常5~7カ月頃から、斜視、筋緊張の亢進、後弓反張、嚥下困難等の神経症状を認め呼吸器感染症や、Gaucher細胞の肺への浸潤のため、多くは6カ月から3歳までに死亡する。本邦の報告⁴⁾では乳児型 Gaucher 病が、全体の約半数を占めている。若年型 Gaucher 病は、神経症状が認められているが、その進行は緩徐で多くは5歳から10歳まで生存し、中には学童期、思春期を越えて生存した症例も報告されている。頻度は、非常に稀ではあるがスウェーデンからの報告が多い⁴⁾。しかし、以上にのべた3型の他に、 β -glucosidase活性の著明な低下にもかかわらず、肝、脾などの実質臓器に、Glc-cerの蓄積を認めない Gaucher 病等も報告され⁵⁾、その遺伝的異質性の存在が問題となってきた⁶⁾。これらの各病型における Glc-cer β -glucosidase 活性は、いずれも低値を示してい

るが、その程度と臨床症状は必ずしも相関していない。ただ臨床症状の軽度な例では、その残存活性が高い傾向にあると言えよう。

最近、各病型間の差異を、生化学的に解明しようとして、種々の検索がなされている。各病型での諸臓器における蓄積物質あるいは、酵素活性の検討⁷⁾がなされている。Grew等⁸⁾は、酸性リン脂質 (Phosphatidylserine)の添加により、脾における β -glucosidase活性が、乳児型 Gaucher 病に比し、成人型 Gaucher 病において、より強く活性化される事実を報告し、更には、脳においても同様の傾向が得られることを報告している。更には、神経症状の出現に関する glucosylsphingosineの重要性⁹⁾等が問題とされてきている。

Ginns等¹⁰⁾は、3種の分子量の異なる β -glucosidaseの存在を皮膚線維芽細胞と脳組織において確認し、それぞれの分子量が、Gaucher 病の各病型に対応していることから、酵素の processingの異常により、表現型の差が出現するのではないかと報告している。

しかし、このような酵素の異常が、各病型に存在するとしても、蓄積する Glc-cer が、各細胞内で、どのように代謝され、各病型ではいかなる差異があるのかを観察することは試みられていない。

今回、著者は、培養皮膚線維芽細胞を用いて、収穫細胞を用いた従来の方法による酵素活性測定 (*in vitro* 酵素活性) と、living cellを用いた Glc-cerの細胞内取り込みと代謝速度の測定 (*in vivo* 酵素活性)、及び細胞内代謝過程の追跡を行い、Gaucher 病の各病型、Farber 病、I-cell 病について、その代謝速度の差、代謝パターンの差を直接に観察し、これら代謝異常を示す疾患及び正常細胞での Glc-cerの代謝について検討した。

2 実験方法

2.1 皮膚線維芽細胞の培養

成人型 Gaucher 病3例、乳児型 Gaucher 病2例、I-cell 病2例、Farber 病1例より得られた皮膚線維芽細胞 (細胞)を用いた。対照は、先天性代謝異常症を疑われたが、酵素学的に正常と診断された7例より得られた細胞である。各対象より得られた細胞を、10%非動化牛胎児血清 (Filtron PTY. LTD. mycoplasma cleaned)を含む、Eagle's Minimal Essential Medium (Eagle's MEM, Nissui)を加え、CO₂インキュベーター (5% CO₂ 37℃)中で静置培養し、5~7日目毎に継代培養を行った。

2・2 ^{14}C -ステアリン酸標識 Glc-cer (^{14}C -Glc-cer) の調整

Erikson and Radin¹¹⁾の方法により、Gaucher 病患者者脾より得られた Glc-cer を、水酸化カリウム-n-ブタノール溶液中でアルカリ水解し、蒸留水で透析し、凍結乾燥後、Unisil Silica Gel (200~300 mesh Clarkson Chemical Co.) カラムクロマトグラフィーにより glucosylsphingosine を純化した。

[1- ^{14}C] ステアリン酸 (50 mCi/mmol, New England Nuclear) をチオニルクロリド中でアシルクロリド化し、得られた Stearoylchloride を glucosylsphingosine とテトラヒドロフラン-50%酢酸ナトリウム溶液中で30分混和しカップリング後、生成した ^{14}C -Glc-cer を前述のカラムクロマトグラフィーにて純化した。

得られた ^{14}C -Glc-cer の放射能純度は、薄層プレート (Silica Gel 60, E. Merck) で展開溶媒クロロホルム：メタノール：水 (70 : 30 : 5, V/V/V) にて展開後、Glc-cer 部分の放射能測定から、98.7%と決定された。分子内の放射能分布を決定するために、Salsman and Ledeen¹²⁾の方法により、メタノリシスを施行した。99.6%の放射活性が脂肪酸部分に分布していることが確認された。

^{14}C -Glc-cer の比放射活性は、放射能測定とアンスロン法¹³⁾による Glc-cer 定量から計算した。

得られた ^{14}C -Glc-cer をクロロホルム：メタノール溶液 (2 : 1, V/V) に溶解し、非標識 Glc-cer を適量加えて希釈し、以下の実験に使用した。

2・3 *In vitro* 酵素活性の測定

Confluent に達した細胞を洗浄後、ラバーポリスマンを用いて剥離、小ガラスホモジナイザーに集め遠心後、蒸留水でホモジナイズしたものを酵素試料とした。

Glc-cer β -glucosidase 活性の測定は、Wenger and Roth¹⁴⁾の方法に従った。約 1000 cpm/n mole に調整したクロロホルム：メタノール溶液の ^{14}C -Glc-cer 40 n mole, タウロコール酸ナトリウム (Sigma Chemical Co.) 500 μg , オレイン酸 (Sigma Chemical Co.) 50 μg を小試験管にとり、窒素ガス気流下にて乾固後、酢酸緩衝液 (1 M. pH 5.4) 0.1 ml を加えてよく混和溶解し、酵素試料 (蛋白量として 5~15 μg) 及び蒸留水を加え計 0.2 ml の反応液とした。37°C, 20 分間インキュベート後、1 ml のクロロホルム：メタノール溶液 (2 : 1, V/V) を加え、反応を停止させ、混和、遠心し、下層の脂質層の 0.6 ml をガラス試験管にとり、窒素ガス気流下で乾固した。乾固後、0.05 ml のクロロ

ホルム：メタノール溶液 (2 : 1, V/V) に再溶解し、一部をとり、Aquasol 2 (New England Nuclear) 4 ml を加えて、放射能を液体シンチレーションカウンター (Tri-carb 8300, Packard Instrument Co., Inc.) で測定した。同時に 0.03 ml の溶解液を、薄層プレート (Silica Gel 60) で前述の展開溶媒をもちい薄層クロマトグラフィーで分画した。プレートより Autoradiogram を作製後、代謝産物である ^{14}C -Ceramide 及び ^{14}C -Glc-cer に相当する部分のゲルをプレートより剥離し、各々の放射能を液体シンチレーションカウンターにて計測した。スポットした放射能の回収率を確認して酵素活性を測定した。蛋白定量は Lowry 法¹⁵⁾を用いた。

同時に、4-methylumbelliferyl (以後 4-MU と略す。) β -galactopyranoside (Koch-Light) を基質として、 β -D-galactosidase を測定し、各々の細胞の内部コントロールとした。

2・4 放射性培地の調整

Barton and Rosenberg の¹⁶⁾方法を一部改変して、 ^{14}C -Glc-cer-Albumin complex を作製した。クロロホルム：メタノール溶液の ^{14}C -Glc-cer (16,000 cpm/n mole) 40 n mole を滅菌試験管にとり、窒素ガス気流下で乾固した後、最小量の加温したメタノール溶液を加えて再溶解した。

Fatty acid free bovine serum albumin (Sigma Chemical Co.) 25 mg/ml 加リン酸緩衝食塩水 (PBS) 0.5 ml を milipore filter (0.22 μ) を通して、 ^{14}C -Glc-cer メタノール溶液に加え混和後、37°C 温浴中で窒素ガス気流下でメタノールを蒸発させた。次に、MEM 培養液 3.5 ml を加え充分混和し、その一部の放射能を測定し、 ^{14}C -Glc-cer が均一に懸濁されているのを確認し培養フラスコ (25 cm², Corning Glass Work) 一個あたりの放射性培地とした。

2・5 ^{14}C -Glc-cer の細胞内とり込み及び, *in vivo*

Glc-cer β -glucosidase 活性

細胞が confluent に達した後に、培地を除去し、PBS 溶液にて3回洗浄後上記 2・4 によって得られた放射性培地 (^{14}C -Glc-cer 40 n mole を含む 4 ml の培養液) を加え 5% CO₂ 下で培養した。培養開始後、2日目、4日目、6日目に放射性培地を除去し、細胞を生理食塩水で5回洗浄後、0.25% トリプシン-0.01% EDTA を含む PBS 溶液にて細胞を剥離し、小ホモジナイザーに集めた。細胞浮遊液を遠心して回収した細胞を、冷却生理食塩水にて3回洗浄後、0.1 ml の冷却脱イオン水を加えホモジナイズし、その一部をとり蛋白を定量した。次に、細胞のホモジネートに 0.5 ml のク

クロホルム：メタノール溶液(2:1, V/V)を加え、再度ホモジナイズし、充分混和後、遠心により2相に分配した。下層の脂質抽出液の一部の放射能を測定し、細胞内へとり込まれた ^{14}C -Glc-cer量を算出した。約10,000 cpmの脂質抽出液を展開溶媒クロロホルム：メタノール：水(70:30:5, V/V/V)を用いて、薄層クロマトグラフィー(薄層プレート Silica Gel 60)にて分画し、オートラジオグラムを作製して、放射性脂質代謝産物を識別した。 ^{14}C -Glc-cer及びそれぞれの放射性代謝産物に相当する部分を、プレートより剝離し、放射能を液体シンチレーションカウンターにて測定した。代謝産物の同定は、Pollet らの方法¹⁷⁾に従い、多次元薄層クロマトグラフィーをもちいて各種脂質標品フォスファチジルイノシトール(PI)、フォスファチジルコリン(PC)、フォスファチジルセリン(PS)、フォスファタジエタノールアミン(PE)、セラミド(Cer, スフィンゴミエリンのフォスホリパーゼC処理より得た。), コレステロールステアレート(CE), (以上Sigma Chemical Co.)と対比同定した。*in vivo* Glc-cer β -glucosidase活性は、2日目、4日目、6日目の脂質代謝産物のうち、分解されずに細胞内に残存した ^{14}C -Glc-cerの%分布にて表示した。

3 実験結果

3.1 *In vitro* Glc-cer β -glucosidase 活性

In vitro Glc-cer β -glucosidase 活性測定の反応液の脂質抽出部分のオートラジオグラムをFig. 1に示し

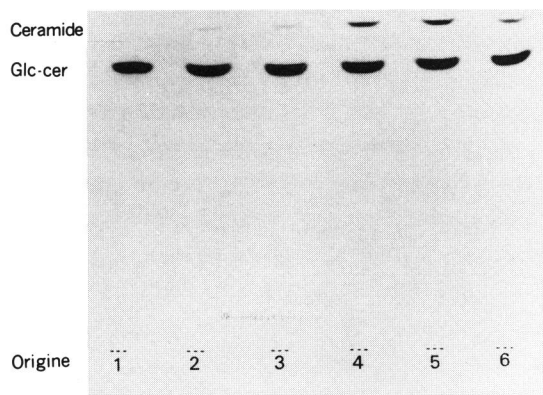


Fig. 1 Autoradiogram of the lipids extracted from the reaction mixture after incubation with fibroblasts homogenate.

Lane 1 ^{14}C -Glc-cer :
Lane 2 Infantile Gaucher disease :
Lane 3 Adult Gaucher disease :
Lane 4 Farber disease :
Lane 5 I-cell disease :
Lane 6 Control.

た。Lane 2~6において、基質である ^{14}C -Glc-cerに加えて、反応産物であるceramideのスポットが認められる。乳児型Gaucher型(Lane 2), 成人型Gaucher病(Lane 3), おけるceramideの生成は、Farber病(Lane 4), I-cell病(Lane 5)及びコントロール(Lane 6)に比べ著明に低下している。*in vitro* Glc-cer β -glucosidase活性をTable 1に示した。コントロール平均値は550 n mole/mg protein/hourであった。乳児型Gaucher病, 成人型Gaucher病では、コントロール値のそれぞれ4%, 7%と著明な活性低下を示した。Farber病, I-cell病では、正常の活性を示した。内部コントロールとしての4MU- β -galactosidase活性はI-cell病をのぞき正常コントロールとほぼ同様な活性を示した。I-cell病において β -galactosidase活性は著明に低下していた。 β -galactosidaseは、本症で活性低下を示すライソゾーム酵素群の1であり、著者の結果は、従来の報告と同様であった。

3.2 ^{14}C -Glc-cerの細胞内とり込み

各細胞における細胞内への ^{14}C -Glc-cerのとり込み量を時間の経過とともに示した(Fig. 2)。すべての患者由来及びコントロール由来の細胞において、そのとり込み量は、2~4日目までは、時間とともに上昇したが、4~6日目にかけてはほぼ飽和された傾向にあった。コントロールとGaucher病の各病型間における差はなく、6日目までに約15~20 n mole/mg proteinが取り込まれた。すなわち、培地内放射性基質のうち約10~15%が、細胞内へとり込まれたと計算された。Farber病では高値、I-cell病では低値であった。また各期日において細胞の形態学的変化は認められず、また放射性培地内で6日間培養したコントロール、乳児型Gaucher病, 成人型Gaucher病由来の細胞の4MU- β -galactosidase活性も正常であった。

3.3 *In vivo* Glc-cer β -glucosidase 活性

Fig. 3に各細胞にとり込まれた ^{14}C -Glc-cerの4日目、6日目における放射性代謝産物のオートラジオグラムを示した。コントロール(Lane 1)では、細胞にとり込まれた ^{14}C -Glc-cerは、まず β -glucosidaseによりceramideへと分解される。ceramideは更にceramidaseにより、1- ^{14}C ステアリン酸が遊離されsphingosineを生じる。遊離した1- ^{14}C ステアリン酸は、中性脂質(CE), 及びリン脂質(PE, PS, PC, PI)の生合成へと利用される。成人型Gaucher病(Lane 2), 乳児型Gaucher病(Lane 3)においても、コントロールと同様の分解、及び1- ^{14}C ステアリン酸の再利用の過程が観察された。

Table 1 *In vitro acid hydrolase activity in cultured skin fibroblasts.*

	Substrate	
	¹⁴ C-glc-cer	4MU-β-galactopyranoside
	n mole/mg protein/hour	
Type I, (adult) Gaucher disease		
Patient 1	42	521
2	36	341
3	33	421
Type II, (infantile) Gaucher disease		
Patient 1	20	446
2	21	443
Farber disease	602	568
I-cell disease		
Patient 1	643	33
2	402	32
Controls (n=7)	550±150	554±77

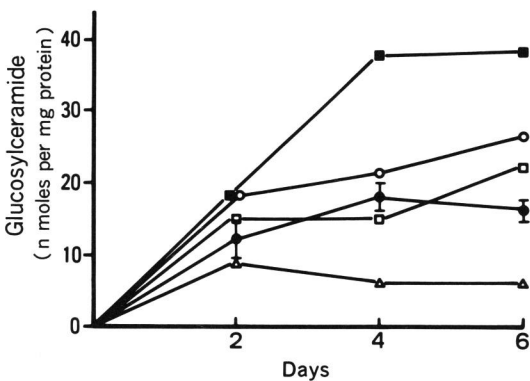


Fig. 2 Uptake of glucosylceramide by cultured skin fibroblasts. Values from 5 cell lines from controls (●) are expressed as mean±SD □ ; Type I, (adult) Gaucher disease (mean, n=3) ○ : Type II, (infantile) Gaucher disease (mean, n=2) ■ ; Farber disease △ ; I-cell disease (mean, n=2)

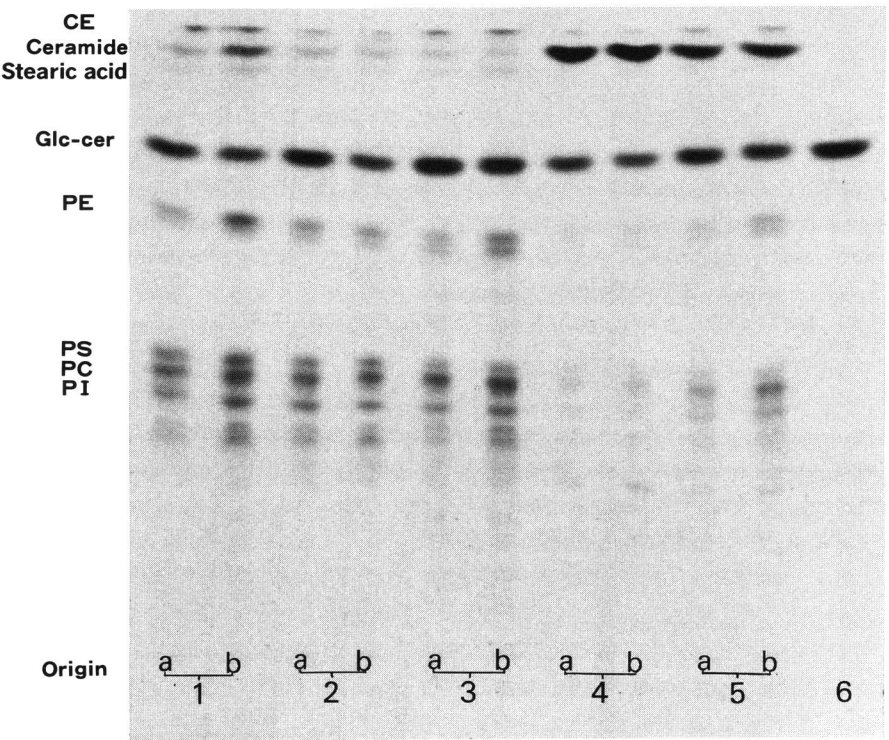


Fig. 3 Autoradiogram of the lipids extracted from the cultured skin fibroblasts. The cells were harvested at day 4(a) and day 6 (b)

Lane 1, Control ;
 Lane 2, Type I, (adult) Gaucher disease ;
 Lane 3, Type II, (infantile) Gaucher disease ;
 Lane 4, Farber disease ;
 Lane 5, I-cell disease ;
 Lane 6, Starting [¹⁴C] Glc-cer.

CE, cholesterol ester ;
 PE, phosphatidylethanolamine
 PS, phosphatidylserine ;
 PC, phosphatidylcholine ;
 PI, phosphatidylinositol.

しかし, Gaucher 病各病型と, コントロールとの間には, その分解産物に量的な差が認められる。Gaucher 病においては, 分解されずに細胞内に存在する ^{14}C -Glc-cer の割合はコントロールより高く Glc-cer β -Glucosidase 活性の低下が示された。Farber 病 (Pane 4) では, ceramide の段階で代謝のブロックが観察され, 1- ^{14}C ステアリン酸から他の中性脂質, リン脂質への生合成は, ほとんど認められない。I-cell 病においても ceramide の段階での代謝ブロックが著明で, Farber 病と同様, ceramidase 活性の著明な低下が示唆された。このことから, とり込まれた ^{14}C -Glc-cer は, ライソゾーム内で β -glucosidase と ceramidase により分解されることが示唆された。

各疾患における *in vivo* ^{14}C -Glc-cer の分解を, 経時的に定量化したのが Fig. 4, 5 である。Fig. 4 で示す如く, コントロールにおいては 4 日目, 6 日目に 70%, 80% の基質が分解されるのに対し, 乳児型 Gaucher 病では, 4 日目 50%, 6 日目 60% であった。成人型 Gaucher 病では, 4 日目 60%, 6 日目 70% でコン

ロールと乳児型 Gaucher 病のほぼ中間値を示した。つまり, 乳児型 Gaucher 病, 成人型 Gaucher 病における *in vivo* Glc-cer β -glucosidase 活性は, それぞれコントロール値の 75%, 85% の値を示した。このことは, *in vitro* β -glucosidase 活性が, 乳児型 Gaucher 病, 成人型 Gaucher 病において, それぞれコントロール値の 4%, 7% と極めて低値であることと対照的であった。Farber 病においては, ceramide の段階でのほぼ完全な代謝ブロック (Fig. 3) があるにもかかわらず, *in vivo* Glc-cer β -glucosidase 活性は, コントロールよりやや高いと考えられた。I-cell 病での代謝速度は, コントロールとほぼ同様であった。

4 考 察

Gaucher 病の原因が, Glc-cer の分解過程の障害に起因することが, 脾組織において Brady 等²⁾が明らかにして以来, Gaucher 病脾においては, Glc-cer のみならず, β -glucoside 結合をもつ合成基質 (P-nitrophenyl- β -glucoside や 4MU- β -glucoside) に対する分

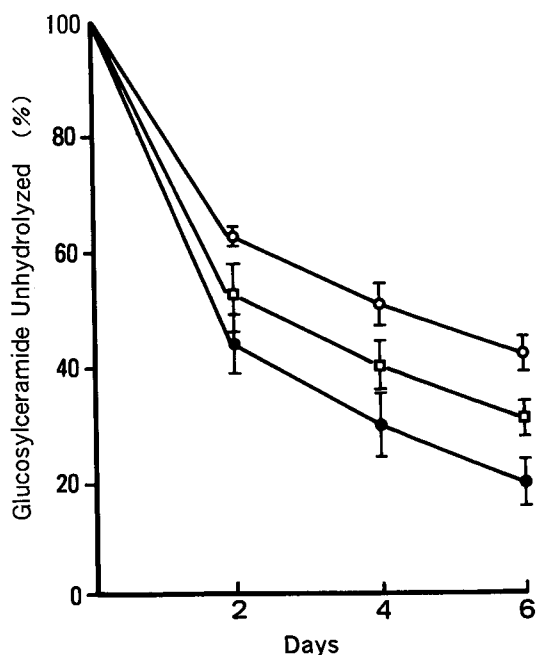


Fig. 4 Percentage of unhydrolyzed glucosylceramide in cultured skin fibroblasts. Values from 5 cell lines from controls (●) are expressed as mean \pm SD. □; Type 1, (adult) Gaucher disease (n=3). ○; Type 2, (infantile) Gaucher disease (n=2).

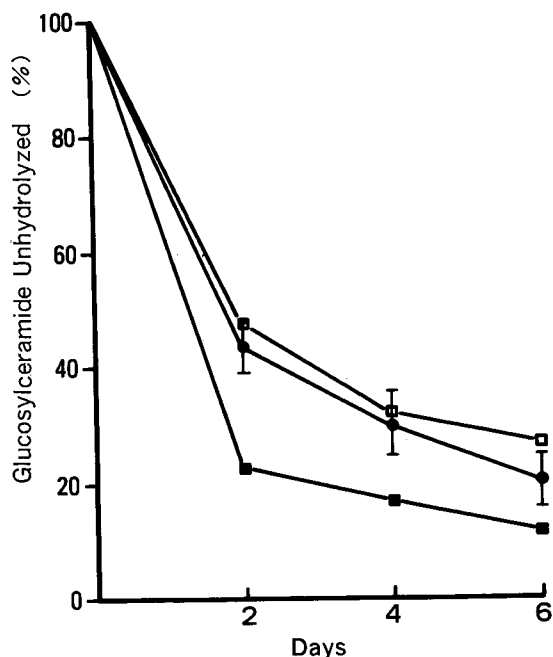


Fig. 5 Percentage of unhydrolyzed glucosylceramide in cultured skin fibroblasts. Values from 5 cell lines from controls (●) are expressed as mean \pm SD. ■; Farber disease □; I-cell disease (mean, n=2)

解能も低下していることが明らかにされた。また、本症患者においては、脾のみならず、肝、白血球、線維芽細胞においても、Glc-cer 及び合成基質に対する β -glucosidase 活性の低下が証明されている¹⁾。しかし、Owada 等¹⁹⁾の報告の如く、肝における合成基質分解能が正常で、Glc-cer β -glucosidase 活性のみが低下している症例も報告されている。Peters 等²⁰⁾は、ヒト肝には2種の酵素学的に性質の異なる β -glucosidase が存在することを報告している。すなわち膜に結合し、Glc-cer 及び合成基質の双方を分解する β -glucosidase と、可溶性分画に存在し、合成基質のみを分解し得る β -glucosidase の存在である。Gaucher 病患者の中には、前者のみが障害されているものと、その双方が同時に障害されているものとがあることを報告している。

Mueller and Rosenberg²¹⁾は、線維芽細胞には、先にのべた肝とは異なり、Glc-cer 及び合成基質の双方を水解し得る1種類の膜結合性 β -glucosidase のみが存在していることを報告している。いずれにしろ、本症の酵素診断においては、線維芽細胞を用いた Glc-cer を基質とした β -glucosidase 活性を測定することが、もっとも信頼し得るものと考えられる。Gaucher 病における β -glucosidase の欠損は、現在までの種々の報告により、酵素蛋白の欠如ではなく、変異酵素による活性の低下であることは周知である^{1,22)}。in vitro 酵素活性の測定は、その特異活性を最大限に発現させるために種々の detergent を添加し緩衝液の存在下で一定の pH の条件下で行われる。ゆえに細胞内、特に intralysosomal な環境とは、かけはなれた条件での測定であるといわざるを得ない。今回、著者の行った in vitro Glc-cer β -glucosidase 活性測定においては、成人型 Gaucher 病、乳児型 Gaucher 病のいずれの細胞においても、その残存活性は、正常の7%、4%と極めて低値であった。おそらく、Gaucher 病細胞における変異酵素が、極めて不安定であり、in vitro の条件下で容易に活性を失うことから、いずれもが極めて低値であることが推測され、このわずかの差を以て、Gaucher 病各病型間の差を論じることとはできないと考えられる。

¹⁴C-Glc-cer 細胞内とり込み、及び in vivo Glc-cer β -glucosidase 活性測定において、細胞内への ¹⁴C-Glc-cer の取り込みは、疎水性の基質である ¹⁴C-Glc-cer をいかに培養液中に拡散し、かつ代謝過程を観察するに十分な基質量を細胞に取り込ませるかが問題となる。本編で述べた ¹⁴C-Glc-cer Albumin complex として培養液中に懸濁する方法が、最も効果的であり、Glc-cer 代謝を追跡するに充分な量の ¹⁴C-Glc-cer が細胞内に取り

込まれることが知られた。

Albumin complex としての Glc-cer は、おそらく受容体を介するエンドサイトーシスの機構により細胞内へ取り込まれ、ライソゾーム内へ移行し、ここで代謝を受けるものと推測される。

本実験系において、ライソゾーム酵素の一つである ceramidase を欠く Farber 病の細胞では、Glc-cer から ceramide への代謝はコントロールと同様であったが、ceramide の段階でのほぼ完全な代謝ブロックが観察された。この Farber 病における今回の代謝パターンは、著者の方法が ¹⁴C-Glc-cer のライソゾーム内の代謝過程を反映していることの一証明と考えられた。

I-cell 病においては種々のライソゾーム酵素 (Galactosylceramide β -galactosidase, Lactosylceramide β -galactosidase, GM1 ganglioside β -galactosidase, Sphingomyelinase など) の活性低下がみられるが、 β -glucosidase 活性及び acid phosphatase が正常であることが特徴として知られている。筆者の得た I-cell 病患者細胞での in vivo での代謝パターンの観察においても、過去の in vitro での β -glucosidase 活性と同様に in vivo Glc-cer β -glucosidase 活性は正常であった。ceramidase は Farber 病同様、活性の著明な低下が同時に証明された。

Gaucher 病においては、正常と同様の分解、及び ¹⁴C ステアリン酸の再利用パターンが観察された。しかし、代謝速度にコントロール Gaucher 病の各病型間に有意の差を認めた。この代謝速度の差は、コントロール、Gaucher 病成人型、乳児型の順で段階的であり、Gaucher 病の各病型の臨床的重症度と密に相関していると考えられた。近年、Ginns 等は、正常脳組織及び線維芽細胞において、63,000、61,000、56,000 と3種の分子量の異なる β -glucosidase が存在することを免疫学的方法を用いて証明し、正常コントロール及び成人型 Gaucher 病においては、56,000 の分子量のものが主体に存在するのに対し、神経症状の強い乳児型、若年型 Gaucher 病においては、高分子量の β -glucosidase が主体となっており、56,000 の低分子量の β -glucosidase が欠落していることを報告した。従来、各病型の線維芽細胞間の融合細胞においては、 β -glucosidase 活性の補正は認められないことが知られている。これらのことから、Gaucher 病では、種々の酵素変異が起こり、precursor から processing の異常により各病型が発現し、低分子量の β -glucosidase の欠落が、臨床的重症度と神経症状の発現に関与しているのではないかと推測されている。

本実験は、細胞内における Glc-cer の代謝から、各病型の差を見い出そうとしたアプローチであり、得られた結果は、上記のような酵素状況を反映し、各病型間の段階的な代謝速度の差を示しているとも考えられる。

1982 年, Nillson and Svennerholm⁹⁾ は、乳児型、若年型 Gaucher 病の脳、小脳皮質の蓄積物質の詳細な分析を行い、本来、正常人の脳組織には存在しない、glucosylsphingosine (Glc-sphingosine) が認められたとして、この両型の神経学的異常に Glc-sphingosine が大きく関与しているのではないかと報告している。すなわち、Glc-cer 脳内蓄積も確かに存在するが、Glc-cer それ自体は、細胞毒性をもたず更にその蓄積自体も神経細胞そのものではなく、血管周囲への蓄積を主体としていることから、細胞毒である Glc-sphingosine による神経症状の発現の重要性が問題とされている。Gaucher 病由来の皮膚線維芽細胞においては、Glc-cer β -glucosidase 活性の低下とともに Glc-sphingosine β -glucosidase 活性も低下していることは、過去に報告されている。1985 年 Vaccaro ら²³⁾ は、Glc-cer β -glucosidase 及び Glc-sphingosine β -glucosidase の酵素の特性につき、詳細な検討を行った。双方の基質に対する分解酵素は、至適 pH、熱安定性、detergent に対する反応に相異があるが、Glc-sphingosine β -glucosidase 活性が、Glc-cer β -glucosidase 活性の約 1/100 であり、この活性比は皮膚線維芽細胞、胎盤、胎盤における Mitochondria-lysosome 分画においても同一の比率であった。更には双方の基質が互いに競合しない事実により、双方の基質を分解する酵素は、binding site の異なる同一の酵素であり、Gaucher 病における酵素変異は、その双方の基質に対する active site の変化であろうと報告している。本実験系においては、基質の標識部分は脂肪酸部分であることから、もし ^{14}C -Glc-cer から最初にグルコースが遊離されるのではなく、まだ知られていないリパーゼにより、 ^{14}C -ステアリンが遊離されるならば、 ^{14}C -ステアリン酸は、他の脂質の生合成へ直接再利用される。この場合には、次の段階での、リン脂質の生合成過程は、ceramide を経て代謝された経路による場合と区別することは不可能となる。この時には、Glc-sphingosine が生成されるが、標識がなく検出されないことになる。

前述の報告のように、細胞毒と知られる Glc-sphingosine が、微量ではあるが蓄積し、Glc-cer β -glucosidase の基質となり得るならば、グルコースあるいは sphingosine を標識した Glc-cer による筆者の行っ

た *in vivo* を含めた検索は、さらに本病態を理解するに有効な方法となると考えられる。

5 結 語

Gaucher 病の各度型及び正常対照より得られた培養皮膚線維芽細胞において、*in vitro* C-Glc-cer β -glucosidase 活性測定及び、 ^{14}C -Glc-cer の *in vivo* の細胞内取り込み及び細胞内代謝過程の追跡を行い、比較検討を行った。その結果は以下のごとくである。

1) *in vitro*, *in vivo* β -glucosidase 活性

Gaucher 病細胞においては、その変異酵素の不安定性ゆえに、正常の約 4~7% と、極めて低い残存活性しか発見し得ないのに対し、*in vivo* β -glucosidase 活性は、正常の約 75%~85% の高い残存活性を示しかつ、Gaucher 病の各病型間の差異も明確であり、その残存活性は、各病型の臨床的重症度と良く相関していると考えられた。

2) 本編で用いた ^{14}C 脂肪酸標識 Glc-cer は、 ^{14}C -Glucose 標識 Glc-cer よりも、比較的容易に作製し得る。また、本法による細胞内取り込み及び代謝過程の追跡は、より生理的なラインゾーム内環境における酵素状態を直接的に観察し得ることにより、今後、完全なる酵素診断や、出生前診断、更には atypical な症例における酵素状況の解明を可能にする方法であると考えられた。本法において、細胞内代謝過程の追跡が可能となった事実により、今後、Glc-sphingosine 等の異常代謝産物の代謝経路の解明にも本法が寄与し得るものと考えられる。

稿を終えるにあたり、本研究の遂行、及び論文の作製において御指導いただきました、工藤亨講師また、御懇切な御校閲をいただいた中尾亨教授に深く感謝致します。

なお、本研究の要旨の一部は、第 27 回日本先天代謝異常学会 (1984 年、10 月、札幌) において発表した。

文 献

1. Brady, R. O. and Barranger, J. A.: Glucosylceramide Lipidosis: Gaucher disease. In: The metabolic basis of inherited disease, 4th ed. edited by Stanbury, J. B., Wyngaarden, J. B. and Fredrickson, D. S. 842-856, McGraw-Hill, New York (1983).
2. Brady, R. O., Kanfer, J. N. and Shapiro, D.: Metabolism of glucocerebrosidase. Evidence of an enzymatic deficiency in Gaucher disease. Biochem.

- Biophys. Res. Commun. **18**, 221-228 (1965).
3. 大和田 操: リピドーシス(I), ゴーシェ病—最近の知見を中心に— 神経内科 **15**, 215-223 (1981).
 4. Tibblin, E., Dreborg, S., Erickson, A., Hakansson, G. and Svennerholm, L.: Hematological findings in the Norrbottnian type of Gaucher disease. Eur. J. Pediatr. **139**, 187-191 (1982).
 5. Wenger, D. A., Roth, S., T. Kudoh, Grover, W. O., Tucker, S. H., Kaye, E. M. and Ullman, M. D.: Biochemical studies in a patient with subacute neuropathic Gaucher disease without visceral glucosylceramide storage. Pediatr. Res. **17**, 344-348 (1983).
 6. Wenger, D. A., and Olson, G. C.: Heterogeneity in Gaucher disease. In: Lysosomes and Lysosomal Storage Disease. edited by Callahan, J. W. and Lowden, J. A. 157-171, Raven Press, New York (1981).
 7. Svennerholm, L., Hakansson, G., Mansson, J. E. and Nilsson, O.: Chemical differentiation of the Gaucher subtypes. Prog. Clin. Biol. Res. **95**, 231-252 (1982).
 8. Glew, R. H., Daniels, L. B., Clark, L. S. and Hoyer, S. W.: Enzymic differentiation of neurologic and nonneurologic form of Gaucher's disease. J. Neuropathol. Exp. Neurol. **41**, 630-641 (1982).
 9. Nillson, O. and Svennerholm, L.: Accumulation of glucosylceramide and glucosylsphingosine (Psychosine) in cerebrum and cerebellum in infantile and juvenile Gaucher disease. J. Neurochem. **39**, 709-718 (1982).
 10. Ginns, E. I., Brady, R. O., Rirruccello, S., Moore, C., Sorrel, S., Furbish, S. H., Murray, G. J., Tager, J. and Barranger, J. A.: Mutation of glucocerebrosidase: Distinction of neurologic and non-neurologic phenotypes of Gaucher disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **79**, 5607-5610 (1982).
 11. Erickson, J. S. and Radin, N. S.: N-Hexyl-O-glucosylsphingosine, an inhibitor of glucosylceramide β -glucosidase. J. Lipid Res. **14**, 133-137 (1973).
 12. Salsman, K. and Ledeen, R.: Fatty acid and longchain base composition of adrenal medulla ganglioside. Lipids **5**, 751-756 (1970).
 13. Spiro, R. G.: Analysis of sugars found in glycoproteins. Methods Enzymol. **8**, 4-5 (1966).
 14. Wenger, D. A. and Roth, S.: Homozygote and heterozygote identification. Gaucher Disease. In: A century of Delineation and Research. 551-572, Alan R. Liss, Inc., New York (1982).
 15. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin-phenol Reagent. J. Biol. Chem. **193**, 265-275 (1951).
 16. Barton, N. W., and Rosemberg, A.: Metabolism of glucosyl [^3H] ceramide by human skin fibroblasts from normal and glucosylceramidotic subjects. J. Biol. Chem. **250**, 3966-3971 (1974).
 17. Pollet, S., Ermidow, S., Saux, L., Monge, M. and Baumann, N.: Micro-analysis of brain lipids: Multiple two dimensional thin layer chromatography. J. Lipid Res. **19**, 916-921 (1978).
 18. Wenger, D. A., Sattler, M., Clark, C. and Wharton, C.: I-cell disease: Activities of lysosomal enzymes toward natural and synthetic substrates. Life Sci. **19**, 413-420 (1976).
 19. Owada, M., Sakiyama, T. and Kitagawa, T.: Neuropathic Gaucher's disease with normal 4-methylumbelliferyl- β -glucosidase activity in the liver. Pediatr. Res. **11**, 641-645 (1977).
 20. Peters, S. P., Coyle, P. and Glew, R. H.: Differentiation of β -glucocerebrosidase from β -glucosidase in human tissues using sodium taurocholate. Arch. Biochem. Biophys. **175**, 569-582 (1976).
 21. Mueller, O. T. and Rosenberg, A.: β -Glucoside hydrolase activity of normal and glucosylceramidotic cultured human skin fibroblasts. J. Biol. Chem. **252**, 825-829 (1977).
 22. Choy, F. Y. M. and Davidson, R. G.: Gaucher's disease, Studies on the kinetics of β -glucosidase and effects of Sodium Taurocholate in normal and Gaucher's tissue. Pediatr. Res. **14**, 54-59 (1980).
 23. Vaccaro, A. M., Muscillo, M. and Suzuki, K.: Characterization of human glucosylsphingosine glucosyl hydrolase and comparison with glucosylceramidase. Eur. J. Biochem. **146**, 315-321 (1985).
-
- 別刷請求先:
(〒060) 札幌市中央区南1条西16丁目
札幌医科大学小児科学講座 草野 孝